

ヒト単球のインターロイキン6遺伝子発現に対する インターロイキン1および腫瘍壊死因子 (TNF- α) の役割

金沢大学医学部小児科学講座 (主任: 谷口 昂教授)

加 藤 公 孝

(平成3年4月10日受付)

ヒト単球が産生するサイトカイン (モノカイン) の発現は他のモノカインによって自己分泌 (autocrine) 的に制御されている。単球が産生するサイトカインのひとつであるインターロイキン6 (interleukin-6, IL-6) の発現が、他の単球由来のモノカイン、インターロイキン1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-6 自身などによりいかに制御されているかを調べた。ヒト末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) を用いて IL-6 産生が各サイトカインの組み換え型 (recombinant) 標品および抗ヒト IL-1 β 抗体でどのように影響を受けるかを検討した。PBMC を組み換え型インターロイキン1 β (recombinant IL-1 β , rIL-1 β) および組み換え型腫瘍壊死因子 (recombinant tumor necrosis factor- α , rTNF- α) で刺激すると、上清中の IL-6 活性はリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激の場合と同程度誘導された。IL-6 メッセンジャー RNA (messenger RNA, mRNA) 発現も、rIL-1 β および rTNF- α 刺激培養時に認められた。PBMC の IL-1 β mRNA の発現は rTNF- α 刺激で認められ、さらに rIL-1 β 自身の刺激でも誘導された。単球の細胞表面マーカーである CD14 に対する単クローン抗体を用いた免疫蛍光法と原位分子雑種形成 (イン・サイツ・ハイブリダイゼーション, in situ hybridization) を組み合わせると、rIL-1 β あるいは rTNF- α 刺激 PBMC における IL-1 β 、IL-6 各 mRNA 発現細胞の同定を試みたところ全て CD14 陽性単球であることが判明した。また各種刺激による IL-6 遺伝子発現の経時変化を解析したところ、rTNF- α 刺激時の IL-6 mRNA の発現誘導は rIL-1 β 刺激の場合に比較し遅延し、12~24時間後にピークを認めた。さらに重要なこととして、rTNF- α 刺激 IL-6 mRNA 発現誘導の系に予め抗 IL-1 抗体を添加して培養すると、rTNF- α による IL-6 遺伝子発現が部分的に抑制された。これら IL-1 や TNF- α による IL-6 遺伝子発現の誘導とは対照的に、IL-6 自身は LPS 刺激時のみならず IL-1 β や TNF- α 刺激による IL-6 遺伝子発現の誘導に抑制的に働くことが示された。以上の結果から、単球上でモノカインが形成するサイトカイン・ネットワークのカスケードの中で、TNF- α は今回検討した主要な単球由来サイトカインの中で最も中心的役割を担っており、単球ではまず TNF- α により IL-1 産生が誘導され、産生された IL-1 がオートクラインに IL-6 発現を誘導するというカスケードが存在する可能性が示された。さらに IL-6 は単球におけるこれらサイトカインの誘導の最終産物で、このサイトカイン・ネットワークに対してネガティブ・フィードバック・シグナルを与えている可能性が示唆された。

Key words interleukin-6, interleukin-1, tumor necrosis factor- α , monocyte, cytokine network

Abbreviations: cDNA, complementary DNA; [α - 32 P] dCTP, deoxycytidine 5'-[α - 32 P] triphosphate; DTT, dithiothreitol; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IL-1, interleukin-1; IL-6, interleukin-6; kb, kilobase pairs; LPS, lipopolysaccharide; MMT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; mRNA, messenger RNA;

インターロイキン 6 (interleukin-6, IL-6) は、ヒト B 細胞分化因子 (B cell stimulatory factor 2, BSF-2) として cDNA (complementary DNA) がクローニングされ、従来より研究されていたインターフェロン β 2 (interferon β 2, IFN β 2), 26 キロダルトン蛋白、肝細胞刺激因子 (hepatocyte-stimulating factor, HSF), ハイブリドーマ・プラズマサイトーマ増殖因子 (hybridoma/plasmacytoma growth factor, HPGF) と同一分子であることが次々と明らかになってきている¹¹⁻⁹。この分子は、多彩な生物活性を持ち免疫反応および炎症反応における複雑な調節機構を制御する因子として注目を集めている^{6,7}。それら多岐にわたる生物学的活性の中でも、特に IL-6 が持つ急性期蛋白の誘導能は感染や組織障害時における生態防衛反応の一つとして重要な意義を持っている¹⁰⁻¹⁰。最近の報告では、IL-6 は骨髄における血小板産生を誘導することも明かにされている¹¹⁻¹³。なお IL-6 は生体内で様々な細胞から産生されること報告されているが、その生理的に最も主要な産生細胞は単球・マクロファージ系細胞であると考えられている^{14,15}。

正常人の血清中には IL-6 活性はほとんど検出できず、末梢血中の単球にも IL-6 messenger RNA (mRNA) は構成的には発現されてはいないが、マイトゲン、細菌成分、多くのサイトカインなどの様々な刺激で IL-6 は単球より直ちに産生・分泌される¹⁶⁻²⁰。単球における IL-6 遺伝子発現の制御機構を調べるに当たって、他の単球由来のサイトカイン (モノカイン)、すなわちインターロイキン 1 (interleukin-1, IL-1) と腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) が強い IL-6 産生誘導能を有することは重要な点と考えられる^{19,20}。TNF- α は単球に対する IL-6 誘導能を持つと同時に、単球からの IL-1 産生も誘導する²¹。また、IL-1 は単球に対する IL-1 自身の発現・産生誘導能を持つことが知られてきている²²。このような IL-1 および TNF- α の単球へのサイトカイン誘導作用が解析されるのと平行して、近年、末梢血単球細胞表面上に IL-1 リセプター (interleukin-1 receptor, IL-1R) と TNF- α リセプター (tumor necrosis factor- α receptor, TNF- α R) の存在が確認された^{23,24}。さらに最近の研究では IL-6 のレセプター (interleukin-6 receptor, IL-6R) も単球上に同定され

ている²⁵。これらモノカイン同士が持つ協力作用やお互いの誘導効果は、微生物が侵入した際や組織障害時に即座に生体防御機構を活性するのに必要な生物学的増幅機構の一つであるかも知れない²⁶。しかしながら、IL-6 が IL-6 自身の遺伝子発現の制御にどの様にかかわっているのか、また IL-6 は逆に IL-1 や TNF- α の産生を誘導するかどうかについては未だ解明されていない。

本研究では、組み換え型 (recombinant) IL-1, TNF- α および IL-6 標品、また抗ヒト IL-1 抗体を用いて単球の IL-6 遺伝子発現に対する各サイトカインの効果を検討した。その結果、TNF- α が単球におけるその他のモノカインの産生・発現に中心的役割を演じていること、また IL-6 はモノカインの誘導にネガティブ・フィードバック・シグナルを送っていることが判明した。

材料および方法

I. 材料

成人末梢血は、25~35歳までの健康成人有志よりヘパリン加静脈血採取により得た。ヒト組み換え型 IL-6 (recombinant interleukin-6, rIL-6) は大阪大学細胞工学センター、平野俊夫博士より供与され、その特異活性は IL-6 反応性エプスタイン・バーウイルス (Epstein-Barr virus) 感染細胞株である SKW6-C14 を用いたアッセイ法で 5×10^4 U/mg の標品を用いた⁹。ヒト組み換え型 IL-1 β (recombinant interleukin-1 β , rIL-1 β) (2×10^4 U/mg) は大塚製薬株式会社 (徳島)、平井嘉勝博士より供与されたものを、またヒト組み換え型 TNF- α (recombinant tumor necrosis factor- α , rTNF- α) (4.8×10^4 U/mg) はサントリ株式会社 (東京) から供与された。

II. 培養条件

成人末梢血をリン酸緩衝液生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.2) で 2 倍に希釈した後、Ficoll-Hypaque Lymphoprep (Nycomed As, Oslo, Norway) に重層し、4℃ 400×g で 30 分間遠心した。中間層の末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) を採取し、PBS で 3 回洗浄後、細胞数 5×10^4 /ml に調整、ペニシリン 200 U/

ND, not detected; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; rIL-1, recombinant interleukin-1; rIL-6, recombinant interleukin-6; rTNF- α , recombinant tumor necrosis factor- α ; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, standard saline citrate; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; [α -³⁵S] UTP, [α -³⁵S] uridine triphosphate

ml), ゲンタマイシン ($10\mu\text{g/ml}$), タイロシン (Tylocine, $60\mu\text{g/ml}$) を含む RPMI-1640 培養液 (GIBCO) に浮遊させた。培養にはポリプロピレン・チューブ (Falcon polypropylene, No.2005; Becton Dickinson & Co., Lincoln Park, NJ, USA) に 1ml ずつ分注し, 一定時間, 炭酸ガス培養器にて 37°C , 5% CO_2 存在下で培養した。培養開始時に rIL- 1β 20ng/ml , rTNF- α 20ng/ml を, またリポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) は至適濃度の $1\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ添加した²⁹⁾。

III. IL-6 活性, IL- 1β 量および TNF- α 量の測定

IL-6 活性の測定は, 大阪大学細胞工学センター, 平野俊夫博士より供与されたマウスハイブリドーマ・クローン MH60.BSF2 (murine hybridoma clone, MH60.BSF2) を用いた細胞増殖反応により行った²⁹⁾。MH60.BSF2 の増殖については, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) を用いた比色定量法により, 550nm における吸光度を酵素免疫測定装置 (ELISA Analyzer EAR400; SLT-Lab Instruments, Salzburg, Austria) で測定した。IL-6 活性は rIL-6 により得られた標準曲線をもとに算出した。培養上清中の IL- 1β の定量には抗ヒト IL- 1β マウス単クローン抗体および抗 IL- 1β 家兎抗血清を用いた酵素結合免疫吸着定量法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) キット (大塚製薬) を, TNF- α の定量には ELISA による TNF Test Kit (BIOK-INETM, T cell science Inc., Cambridge, MA, USA) をそれぞれ使用した。

IV. IL-6 および IL- 1β mRNA 発現量の測定

IL-6 および IL- 1β mRNA 発現量の測定はノーザンプロットおよびドットプロット・ハイブリダイゼーション法にて行った。刺激培養後 PBMC より全 RNA を Chomczynski らの方法²⁹⁾で抽出しノーザンプロット・ハイブリダイゼーションに供した。各検体毎に全 RNA $5\mu\text{g}$ を変性させた後, ホルムアルデヒドを含む 1% アガロース・ゲルで電気泳動し, 毛細管現象により $20\times$ standard saline citrate (SSC) (3M NaCl, 0.3M クエン酸ナトリウム液) にてナイロン・メンブラン・フィルターに RNA を移行させた。ドット・プロット用には White らの方法³⁰⁾に準じて抽出した細胞質内 RNA を用いた。核除去細胞質溶解物を段階希釈し, 変性後ナイロン・メンブラン・フィルターに吸引吸着させた。次に, 各フィルターを風乾後, 80°C 2時間熱処理して RNA を膜に固定した。

ハイブリダイゼーションは, プレハイブリダイゼー

ション溶液 (50% ホルムアミド, $5\times$ SSC, $5\times$ Denhardt's solution, 50mM NaHPO₄, 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate), 0.2mg/ml 熱変性サケ精子 DNA (salmon sperm DNA, ssDNA)) 中で 65°C 2時間行った。プレハイブリダイゼーション溶液除去後, $5\times 10^6\text{cpm/ml}$ の標識プローブ DNA を含む新たなプレハイブリダイゼーション溶液を加えた。プローブ DNA として平野博士 (大阪大学, 大阪) より供与されたヒト IL-6 cDNA の Taq I-Xba I フラグメント, 平井博士 (大塚製薬) より供与されたヒト IL- 1β cDNA³¹⁾ の Pst I-HindIII フラグメント, β -アクトリン cDNA³²⁾ の BamHI-PvuII フラグメントそれぞれを, deoxycytidine 5'-[α -³²P] triphosphate ([α -³²P] dCTP) ($>3,000\text{Ci/mmol}$) を標識基質としてマルチプライム DNA ラベリングシステム (アマシャム・ジャパン, 東京) を用いて標識した。その標識プローブと 42°C 16時間ハイブリダイゼーションを行った後, $2\times$ SSC にて15分洗浄, さらに 0.1% SDS を含む $0.1\times$ SSC にて 65°C 30分処理を3回繰り返した。乾燥後, X線フィルム (HyperfilmTM-MP, アマシャム・ジャパン, 東京) に密着させて -80°C で約24時間オートラジオグラフィーを行った。cDNA とハイブリダイズした mRNA の定量評価にはバイオ・アナライザー (Bio-Analyzer 100, フジ写真フィルム株式会社, 東京) を用いた。

V. リボ・プローブ (riboprobe, RNA probe) の作製

IL-6 および IL- 1β mRNA 検出用のリボ・プローブを作製する目的で, IL-6 cDNA の Taq I-Xba I フラグメントおよび IL- 1β cDNA の Pst I-PvuII フラグメントをそれぞれ発現ベクター pGEM3 (Promega Biotech., Madison, WI, USA) の Acc I-Xba I サイトおよび Pst I-HincII サイトにサブクローニングを行った。その IL-6 cDNA および IL- 1β cDNA をサブクローニングされた各ベクターを制限酵素で切断の後, T7 または SP6 RNA ポリメラーゼ (RNA polymerase) および [α -³⁵S] uridine triphosphate ([α -³⁵S] UTP, アマシャム・ジャパン) を用いて ³⁵S 標識アンチセンス (antisense) およびセンス (sense) リボ・プローブを作製した。

VI. イン・サイト・ハイブリダイゼーション (in situ hybridization)

イン・サイト・ハイブリダイゼーションは前に我々が報告した方法で次のように行った¹⁵⁾。まず, 培養細胞を予めマウス抗ヒト CD 14 単クローン抗体 (Ortho Diagnostic System, K. K., 東京) および山羊抗マウ

ス IgG 抗体を用いて間接免疫蛍光染色した後、ガラス・スライド上にサイトスピン標本を作製した。次に 4%パラホルムアルデヒド/PBS で固定後、グリシン処理し、エタノールにて脱水、風乾した。そして 10 μ l のハイブリダイゼーション溶液 {10⁶cpm ³²S 標識 riboprobe, 50% ホルムアミド, 2 \times SSC, 10mM ディチオスレイトール (dithiothreitol, DTT), 1mg/ml 熱変性 ssDNA, 2mg/ml 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA)} を滴下し、50°C で 16 時間イン・サイツ・ハイブリダイゼーションを行った。54°C の 50%ホルムアミド/2 \times SSC で洗浄後、RNA 分解酵素 {100 μ g/ml RNase A (Sigma), 1 μ g/ml RNase T1 (Behringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN, USA)} 処理を行った。エタノール脱水後のスライド・ガラスは、NR-M2 エマルジョン (コニカ株式会社, 東京) でコートした後、4°C で 3 日間オートラジオグラフィーを行った。現像には D-19 デベロッパ (Eastmann Kodak Company, Rochester, N. Y., USA) および固定液を使用し、水洗後エタノールで包埋した。観察は位相差蛍光顕微鏡 (Zeiss, Oberkochen, Germany) で行った。

成 績

I. PBMC の IL-1 β , IL-6 発現誘導に対する rIL-1 β , rIL-6 および rTNF- α の影響

PBMC を血清無添加 RPMI-1640 培地のみで 24 時間培養した場合、表 1 に示すように上清中の IL-6, IL-1 β , TNF- α はほとんど検出できなかった。rIL-1 β , rTNF- α 添加により、添加したサイトカイン濃度依存性に上清中の IL-6 活性の上昇が IL-6 依存性細胞増殖株の増殖反応として検出された。同時に、rIL-1 β および rTNF- α 添加でも、濃度依存性にそれぞれ上清中の TNF- α , IL-1 β 値の上昇を誘導することが ELISA 法にて確認できた。なお rIL-1 β および rTNF- α 刺激時の単球由来のサイトカインの産生誘導効果は、表 1 に示すように強力なモノカイン誘導因子である LPS で PBMC を刺激したときにほぼ匹敵するものであった。rIL-1 β や rTNF- α とは対照的に、rIL-6 を添加しても PBMC から IL-1 β および TNF- α の産生は誘導されなかった。PBMC によって産生された培養上清中各サイトカイン値の結果と一致して、培養細胞の IL-6 mRNA 発現は rIL-1 β ,

Table 1. IL-6, IL-1 β and TNF- α production by monokine-stimulated PBMC

Stimuli	Doses	IL-6 (U/ml)	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
None		0.3 \pm 0.1 ^a	<50	<50
rIL-1 β	1 ng/ml	6.9 \pm 1.1	N.D. ^b	22 \pm 10
	4 ng/ml	17.3 \pm 3.0	N.D.	59 \pm 21
	20 ng/ml	41.3 \pm 11.2	N.D.	112 \pm 27
rTNF- α	1 ng/ml	24.5 \pm 5.7	215 \pm 65	N.D.
	4 ng/ml	43.1 \pm 17.3	958 \pm 311	N.D.
	20 ng/ml	53.0 \pm 9.7	1480 \pm 365	N.D.
rIL-6	1 ng/ml	N.D.	<50	<50
	4 ng/ml	N.D.	<50	<50
	20 ng/ml	N.D.	<50	<50
LPS	1 μ g/ml	30.4 \pm 7.1	285 \pm 92	79 \pm 19

PBMC were incubated in the absence or presence of various doses of rIL-1 β , rTNF- α and rIL-6 or 1 μ g/ml of LPS. After 24 hr incubation, supernatants were collected, and provided for evaluation of IL-6, IL-1 β or TNF- α . IL-6 activity was measured by the growth of IL-6-dependent murine hybridoma cells, and IL-1 β and TNF- α were determined by using ELISA kits.

^aResults are expressed as the means (\pm SEM) of three separate experiments.

^bN.D., not determined.

rTNF- α 刺激で強く誘導された (図1). さらに重要なことは, rTNF- α のみならず rIL-1 β 自身も PBMC による IL-1 β mRNA 発現を誘導したことである. しかし rIL-6 添加は IL-1 β mRNA も IL-6 mRNA 発現も誘導しなかった. コントロールとしたハウスキーピング遺伝子である β -actin の発現量は rIL-1 β , rTNF- α , rIL-6, LPS の各刺激で影響を受けなかった.

II. IL-6 mRNA および IL-1 β mRNA 発現細胞の同定

IL-6 mRNA および IL-1 β mRNA 発現細胞の同定を目的に, 既に報告した方法¹⁵⁾, すなわちイン・サイト・ハイブリダイゼーションと抗 CD 14 単クローン抗体を用いた免疫蛍光法とを組み合わせ, 各サイトカイン発現細胞の細胞表面形質を調べた (図2). rIL-1 β 添加培養した PBMC の一部の細胞は強くアンチセンス IL-6 リボ・プローブでラベルされた (図2A). さらにイン・サイト・ハイブリダイゼーション

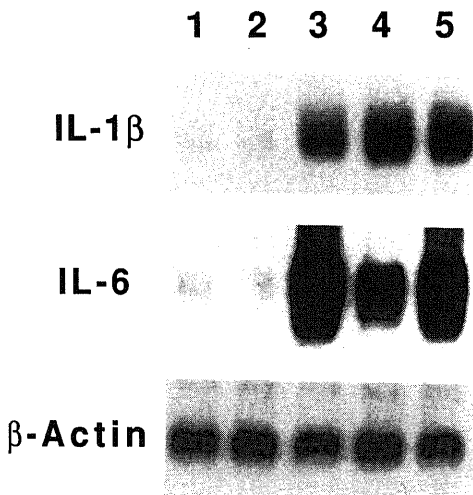


Fig. 1. Induction of mRNA for IL-6 and IL-1 β in PBMC by rIL-1 β or rTNF- α , but not by rIL-6. PBMC (2×10^6 /ml) were cultured for 3 hr with the cultured medium alone or in the presence of rIL-1 β (20ng/ml), TNF- α (20ng/ml), rIL-6 (20ng/ml), or LPS (1 μ g/ml). Expression of mRNA for IL-6, IL-1 β , and β -actin in cultured PBMC was analyzed by Northern blot hybridization as described in Materials and Methods. Exposure time was 1 day for IL-1 β and IL-6, and 12 hr for β -actin. Stimulation conditions are as follows: lane 1, culture medium alone; lane 2, rIL-1 β ; lane 3, rIL-6; lane 4, rTNF- α ; lane 5, LPS.

で検出された多数のグレイン (grains) は CD 14 陽性細胞上でのみ認められ, CD 14 陰性細胞上には存在しなかった (図2B). 次にアンチセンス IL-1 β リボ・プローブを用いた IL-1 β mRNA 発現細胞の検索では, rIL-1 β 自身で刺激した PBMC 中の IL-1 β mRNA 発現細胞は全て CD 14 陽性単球であった (図2C, 2D). 同様に, rTNF- α 刺激 PBMC の IL-6 および IL-1 β mRNA 発現細胞も CD 14 陽性単球であった. なお, 無刺激および rIL-6 刺激 PBMC をアンチセンス IL-6 および IL-1 β リボ・プローブを用いてイン・サイト・ハイブリダイゼーションを試みてもバック・グラウンド・レベルのグレインしか認めなかった. また, コントロールとしてセンス IL-6 および IL-1 β リボ・プローブを使用した場合, どの標本ともハイブリダイゼーションしなかった (データ示さず).

III. rIL-1 β , rTNF- α 刺激による IL-6 mRNA 発現の経時的変化

単球による IL-6 遺伝子発現が各種モノカインによりいかに制御されているかを明らかにする目的で, rIL-1 β および rTNF- α 刺激後の IL-6 mRNA 発現の経時的変化を調べた (図3). PBMC の無添加培養では, いずれの培養時間でもほとんど IL-6 mRNA 発現は認められなかった. これに対し, LPS 添加の場合, IL-6 mRNA は培養後直ちに検出され, 3時間で最大となり, 24~48時間後にはもとの値に戻った. rIL-1 β 刺激後の IL-6 mRNA 発現は, LPS 刺激の場合に比べ幾分遅れ, 6時間後に極値となり, 12~24時間比較的高い値を維持した. rTNF- α 刺激の場合は, rTNF- α 添加後6時間までは IL-6 発現は比較的小なく, しかし培養6時間後より徐々に上昇し, 12~24時間後に IL-6 mRNA 発現は最大となった. これらの結果は, 単球の IL-6 遺伝子発現誘導において IL-1 β および TNF- α の作用機序が異なる可能性を示唆している.

IV. TNF- α の IL-6 mRNA 発現誘導効果に対する抗ヒト IL-1 抗体の影響

これまでに得られた結果から, 単球の一連のモノカイン産生において, TNF- α が単球に作用してまず IL-1 β を誘導し, 分泌された IL-1 β が自己分泌または傍分泌 (paracrine) 的に単球に作用して IL-6 を誘導するというカスケード, すなわち TNF- α が中心的役割をまた IL-1 は中間的役割を担い, さらに IL-6 はこれら一連のモノカインの最終産物であるというカスケードの存在が想定された. そこで rTNF- α により誘導される PBMC の IL-6 産生に対する抗ヒト IL-1 抗体の影響を検討した. 家兎抗ヒト IL-1 α 抗体および家兎抗ヒト IL-1 β 抗体の存在下, 非存在下で PBMC を

rTNF- α で刺激し、12時間後の IL-6 mRNA 発現および24時間後の上清中の IL-6 産生を測定したところ、抗 IL-1 抗体存在時に有意に IL-6 産生および IL-6 mRNA 発現の抑制が認められた (図4)。なお、抗 IL-1 α 抗体または抗 IL-1 β 抗体いずれかを添加した場合は、両抗体を同時添加した場合に比べ、rTNF- α 刺激 PBMC の IL-6 産生および IL-6 mRNA 発現の抑制効果は弱かった。この抗 IL-1 抗体を用いた実験結果は、rTNF- α 刺激により単球で産生された IL-1 が自己分泌または傍分泌的に単球を刺激し IL-6 産生を誘導するカスケードが存在する可能性を示している。

V. rIL-6 による IL-6 遺伝子発現抑制効果

最後に、rIL-1 β および rTNF- α により誘導される PBMC の IL-6 mRNA 発現に外来性の rIL-6 がどのような影響を及ぼすか検討した。PBMC に rIL-6 (100ng/ml) を添加し30分間前培養を施行、培養液で2回洗浄後 rIL-1 β 、rTNF- α あるいは LPS 添加6時間

培養を施行した後、IL-6 mRNA 発現量の変化をノーザンブロット・ハイブリダイゼーションにて評価した。図5に示すように、rIL-1 β 、rTNF- α 、LPS いずれの刺激においても30分間の rIL-6 の前培養により IL-6 mRNA 発現は抑制を受けることがわかった。この IL-6 mRNA 発現抑制効果は、24時間後採取した培養上清中の IL-6 活性にも現れていた (データ示さず)。この IL-6 mRNA 発現抑制効果は、rIL-6 1ng/ml 前処理の場合にも既に認められたが、rIL-6 100ng/ml 添加時において最大であった。このことは LPS 刺激のみならずモノカイン (IL-1, TNF- α) 刺激で誘導される IL-6 遺伝子の転写活性化は IL-6 自身により抑制効果を受けることを示している。

考 察

IL-6, IL-1 および TNF- α は、単球/マクロファージ系細胞で主として産生され、感染や組織障害時にける

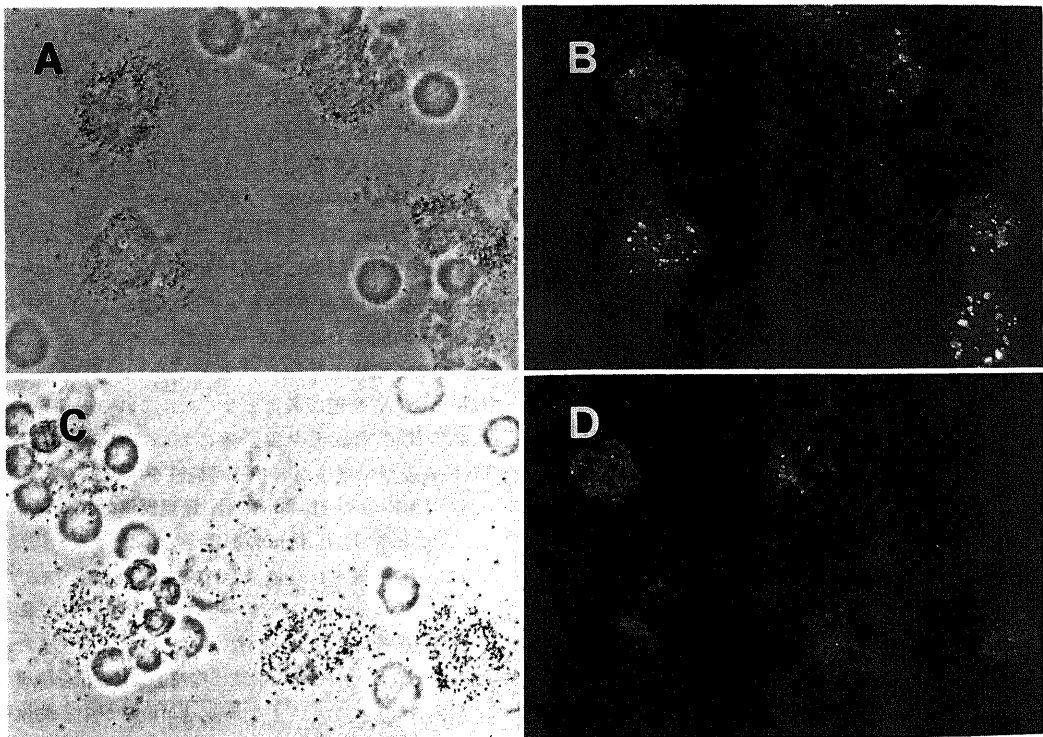


Fig. 2. Identification of cells expressing mRNA for IL-6 or IL-1 β by in situ hybridization. PBMC were cultured with 20ng/ml of rIL-1 β for 4 hr. Cultured PBMC were stained with anti-CD14 mAb and rhodamine isothiocyanate-labeled anti-mouse IgG antibody, and deposited onto glass slides. These slides were subjected to in situ hybridization with 35 S-labeled antisense IL-6 probe (A, B) or antisense IL-1 β probe (C, D). The same areas were photographed by using phase contrast light (A, C) and fluorescence microscopy (B, D). It was here shown that only CD14 $^{+}$ cells were strongly hybridized with antisense IL-6 or IL-1 β riboprobe.

生体防御機構の一役を担っていることが解明されつつある。特に生体内で生じているであろう、IL-6, IL-1, TNF- α といった各サイトカイン間の相互作用について多くの研究が報告されている^{19)~22)33)~35)}。今回の実験では、分離した単球ではなく PBMC の系を用いて、単球の IL-6 産生が他の単球由来性因子、すなわち IL-1 や TNF- α によりどの様に制御されているか解析するとともに、また産生された IL-6 がこのモノカイン産生のカスケードの中でどのような役割を担っているかを検討した。PBMC や単球の分離および培養の過程で、プラスチック面への付着により単球由来の IL-6 産生が誘導されてしまい、これにより外から加えた物質による適当な刺激後の実際の IL-6 産生を評価するのが困難になっていることが指摘されている³⁶⁾。しかしながら、既に報告したように無血清培地の使用およびポリプロピレン・チューブの使用により、IL-6, IL-1 および TNF- α の無添加培養時の産生を極力抑えることが可能となった³⁷⁾。またイン・サイツ・ハイブリダイゼーション法に免疫蛍光法を組み合わせることにより、LPS のみならず IL-1 β , TNF- α 刺激 PBMC から産生される IL-6 および IL-1 β はほとんど

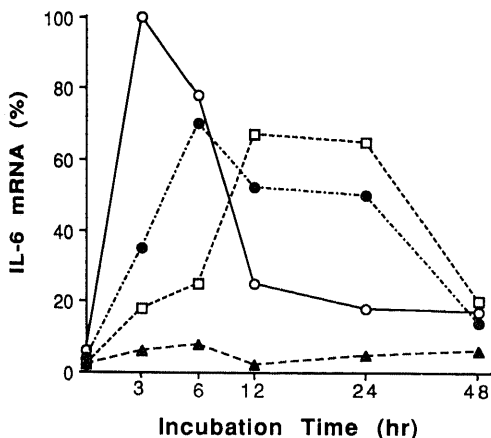


Fig. 3. Kinetics of IL-6 mRNA expressed in PBMC after stimulation with rIL-1 β , rTNF- α , or LPS. PBMC (2×10^6 /ml) were incubated with culture medium alone (▲), 20ng/ml or rIL-1 β (●), 20ng/ml of rTNF- α (□), or 1 μ g/ml of LPS (○). Five μ g of total RNA from cultured PBMC was fractionated by electrophoresis on 1% agarose gel, transferred to nylon membranes, and hybridized with IL-6 cDNA. Quantification of IL-6 mRNA was performed by densitometry. The (%) on the y-axis is presented as percentage of the intensity of band from PBMC for 3 hr incubation with LPS.

単球由来であることが mRNA レベルで確認できた。なお今回の実験は PBMC の培養という系で行われたので、単球以外の細胞に対するサイトカインの作用は完全には否定できないが、ここで得られた結果はサイトカインの単球への直接効果を反映していると考えられた。

これまでの報告と同じく、今回の実験では rIL-1 β および rTNF- α は単球の IL-6 産生を誘導し、このことは mRNA レベルでも確認できた。また rTNF- α 刺激により同様に単球の IL-1 β 遺伝子発現も誘導された。さらに rIL-1 β 添加は自己分泌的に単球からの IL-1 β 遺伝子発現も誘導された。さらに rIL-1 β 添加は自己分泌的に単球からの IL-1 β 自身の発現も誘導した。近年、単球の細胞表面に IL-1 および TNF- α に対するレセプターの存在が確認され、これらモノカインによる単球自身を刺激する機構の存在が支持されている²³⁾²⁴⁾。さらに、外来性の TNF- α 投与により単球培養上清中に TNF- α が放出されるという報告もあり³⁷⁾、これらの所見は、TNF- α と IL-1 は、単球において、相互に発現を誘導すると同時に自己分泌的に自らを誘導する機能を有し、さらには IL-6 誘導能を共に有していることを示している。これに対し今回の実験では IL-6 は、IL-1 β や TNF- α と異なり、IL-6 も含め他のモノカインを誘導しなかった。このように IL-6 はこれらモノカイン誘導能は持たないが、最近の報告では、採取直後のヒト単球の細胞表面には多数の IL-6 レセプター (interleukin-6 receptor, IL-6R) の発現が認められている²⁵⁾。単球の細胞表面上の IL-6R 発現は、rIL-6 添加により減少する。単球細胞表面上の IL-6R の発現は、単球から産生された IL-6 が、単球におけるモノカイン産生のカスケードにおいて何らかの制御機能的役割を果たしている可能性を示唆するが、これまでのところ、IL-6 は単球からの IL-1, TNF- α 、さらには IL-6 自身の発現を増強あるいは抑制するのにかつての報告は無い。今回の実験では、rIL-6 前処理が rIL-1 β , rTNF- α 、さらに LPS 等により誘導される単球の IL-6 発現を有意に抑制することが示された。IL-6 が他のサイトカインの発現にも抑制効果を示すかどうかはここでは検討しなかったが、この点に関しては Schindler らが既に LPS あるいは植物凝集素 (phytohemagglutinin) による PBMC からの IL-1 β および TNF- α 発現を IL-6 が抑制する事実を報告している²⁶⁾。それによると、この IL-6 による IL-1 β , TNF- α 発現の抑制は転写段階でおこるらしい。

IL-1 β , TNF- α や IL-6 は様々な生物学的活性を持

Stimuli	Additives	IL-6 mRNA	IL-6 Activity (U/ml)
None	None		< 0.1
None	Control IgG		0.3
rTNF- α	None		25.0
rTNF- α	Control IgG		24.8
rTNF- α	Anti-IL-1 α		10.4
rTNF- α	Anti-IL-1 β		5.4
rTNF- α	Anti-IL-1 α & -IL-1 β		1.3

Fig. 4. Effects of anti-human IL-1 α and IL-1 β antibody on rTNF-induced IL-6 mRNA expression in PBMC. PBMC (7×10^5 /ml) was cultured with rTNF- α (20ng/ml) in the presence or absence of rabbit anti-human IL-1 α IL-1 α and/or IL-1 β antibody. After 12 hr incubation, cytoplasmic lysates from cultured cells were extracted, and two-fold dilutions of cytoplasmic lysates were loaded onto nylon membranes and hybridized with IL-6 cDNA. The initial blot placed on left side in each case represents lysates from 3.5×10^5 cells. Hybridized membranes were autoradiographed for 4 days. In addition, culture supernatants was obtained from the similar cultures for 24 hr, and provided for evaluation of IL-6 activity.

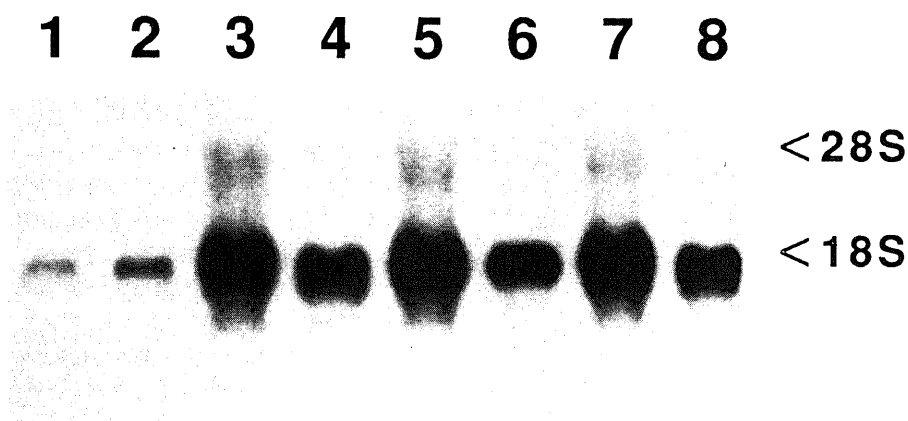


Fig. 5. Northern blot analysis of the effect of IL-6 on monokine-induced IL-6 expression. PBMC were preincubated with rIL-6 (100ng/ml) for 30 minutes and then stimulated with LPS, IL-1 β or TNF- α for 6 hr. Comparison of IL-6 mRNA levels between PBMC without rIL-6-pretreatment (lanes 1, 3, 5 and 7) and PBMC with that (lanes 2, 4, 6, 8) was performed. Lanes 1 and 2, cultured with medium alone; Lanes 3 and 4, with rIL-1 β (5ng/ml); Lanes 5 and 6, with rTNF- α (10ng/ml); Lanes 7 and 8, with LPS (50ng/ml). Northern gels were stained with ethidium bromide to visualize the 18S and 28S ribosomal RNA band.

ち、且つお互いに共通の性質を分けあっていることは広く知られているが²⁰⁾、こと単球由来のサイトカインの自己分泌的な発現の制御に関しては、今回示したように、各サイトカインは異なった役割分担をしているようである。rIL-1 β と rTNF- α 刺激後の IL-6 mRNA 発現量の経時的变化を調べると、各刺激間で発現に差が認められ、rIL-1 β 刺激は rTNF- α 刺激より IL-6 mRNA 発現のピークが早く訪れた。この現象は、rTNF- α 刺激で誘導される単球の IL-6 発現は rTNF- α による IL-1 の産生、分泌を介する間接的効果の結果で説明できるかもしれない。すなわち IL-1 は、TNF- α と異なり、単球からの IL-6 の産生誘導における中間的メディエーターとして作用している可能性が考えられる。そこで今回、rTNF- α 刺激で誘導される IL-6 産生に及ぼす抗 IL-1 抗体の作用を検討したところ、興味あることに抗 IL-1 抗体とくに抗 IL-1 α 抗体および抗 IL-1 β 抗体と一緒に添加したときに、rTNF- α 誘導性 IL-6 産生の抑制が認められた。

TNF- α が単球におけるサイトカインのカスケードに中心的役割を果たすことは、いくつかの生体内 (in vivo) の実験結果^{39)~41)}からも支持され、TNF- α は宿主が組織障害を受けたときもっと早期に分泌されるサイトカインであるかもしれない。動物実験による報告では、致死量の腸菌を投与後、各サイトカインの循環血液中における動態を調べると、TNF- α は 90 分で極値に達したが、IL-1 は 4 時間経過後ピークとなり、また IL-6 レベルは細菌投与後 8 時間前後にわたって高値を呈するという経過を示した³⁹⁾。ヒトの実験では、菌血症や敗血症性ショック時に、まず血中 TNF- α の上昇がみられ、次に IL-6 の上昇が認められるという報告もある⁴⁰⁾⁴¹⁾。さらに実験動物や、ヒトに γ TNF- α を投与すると、循環血液中に IL-6 も含め様々なメディエーターが出現することも報告されている⁴²⁾⁴⁴⁾。TNF- α が一連のサイトカイン産生・放出の誘導に中心的役割を担っていることを支持する最も説得力のあるデータとして、近年、抗 TNF- α 抗体を用いた研究が発表された³⁹⁾。そこでは、ヒビに致死性菌血症を生じさせ、そこに抗 TNF- α 抗体を投与し TNF- α 活性を中和すると効果的に血中への IL-1 および IL-6 の出現を低下させることが可能であったと報告している。

今回の実験からは、IL-6 は単球上での TNF- α と IL-1 との相互作用および相互増幅機構の結果として誘導される最終産物であることが示された。いくつかの病的状態において、IL-6 はその病因としての役割を担っている可能性が報告されているが^{45)~47)}、今回示し

た、IL-6 が IL-1、TNF- α のみならず IL-6 自身の産生をも抑制するという事実は、IL-6 はモノカインの誘導に対して抑制的に働く機能を持ち、内因性に産生される IL-6 は IL-1 や TNF- α の持ついくつかの生物学的有害作用に対し、各サイトカイン産生にネガティブ・フィードバック作用を与えることにより生体を防御する効果を与え、生体内に生じた炎症や組織障害を鎮静化するという重要な役割を演じている可能性を示唆している。

結 論

ヒト末梢血単核細胞を用いて、単球の IL-6 発現に対する単球由来のモノカイン、すなわち IL-1 β 、TNF- α および IL-6 自身の効果を検討し以下の結論を得た。

1. PBMC を rIL-1 β および rTNF- α で刺激した場合、上清中の IL-6 活性は LPS 刺激と同程度認められた。IL-6 mRNA 発現も、rIL-1 β および rTNF- α 刺激培養時に同程度認められた。PBMC を rIL-1 β で刺激すると上清中 TNF- α が、また rTNF- α 刺激では上清中 IL-1 β が検出され、PBMC の IL-1 β mRNA 発現は rTNF- α 刺激時に認められ、さらには rIL-1 β 自身の刺激でも誘導された。rIL-6 刺激では、IL-1 β 、IL-6 いずれの発現も認められなかった。

2. 単球の細胞表面マーカーである CD 14 に対する単クローン抗体を用いた免疫染色とイン・サイツ・ハイブリダイゼーションを組み合わせ、rIL-1 β あるいは rTNF- α 刺激 PBMC における IL-1 β 、IL-6 各 mRNA 発現細胞の同定を試みたところ、全て CD 14 陽性単球であった。

3. rTNF- α 刺激後の IL-6 mRNA 発現誘導は、rIL-1 β 刺激の場合に比較し遅延し 12~24 時間後にピークを認めた。

4. rTNF- α 刺激 IL-6 mRNA 発現誘導の系に、予め抗 IL-1 抗体を添加すると、rTNF- α による IL-6 遺伝子発現が部分的に抑制された。

5. rIL-6 で前培養後、rIL-1 β 、rTNF- α および LPS 刺激を行ったところ、全ての刺激で IL-6 発現が抑制された。このことは IL-6 自身は IL-1 β や TNF- α による IL-6 遺伝子発現の誘導に抑制的に働くことを示している。

謝 辞

稿を終えるに臨み、研究の御指導と御校閲を賜りました恩師谷口昂教授に深甚なる感謝の意を表します。また、終始直接御指導、御教示を頂きました宮脇利男講師、横井透助手、

ならびに小児科免疫グループの諸先生方、教室員の皆様に感謝致します。

文 献

- 1) Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T. & Kishimoto, T.: Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, **324**, 73-76 (1986).
- 2) Sehgal, P. B., May, L. T., Tamm, I. & Vilcek, J.: Human β_2 interferon and B-cell differentiation factor BSF-2 are identical. *Science*, **235**, 731-735 (1987).
- 3) Content, J., Wit, L. De., Pierard, D., Derynck, R., Clercq, E. De. & Fiers, W.: Secretory proteins induced in human fibroblasts under conditions used for the production of interferon β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 2768-2772 (1982).
- 4) Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorf, P. & Baumann, H.: Interferon-b2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7251-7255 (1987).
- 5) Van damme, J., Opdenakker, G., Simpson, R. J., Rubira, M. R., Cayphas, S., Vink, A., Billiau, A. & Van Snick, J.: Identification of the human 26-kD protein, interferon b2, as a cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, **165**, 914-919 (1987).
- 6) Hirano, T. & Kishimoto, T.: Interleukin 6 (IL-6). In M. B. Sporn & A. B. Roberts (eds.), *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol.95, Peptide Growth Factors and Their Receptors, p1-633, Springer-Verlag, Berlin, 1990.
- 7) Van Snick, J.: Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.*, **8**, 253-278 (1990).
- 8) Geiger, T., Andus, T., Klaproth, J., Hirano, T., Kishimoto, T. & Heinrich, P. C.: Induction of rat acute-phase proteins by interleukin-6 in vivo. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 717-721 (1988).
- 9) Marinkovic, s., Jahreis, G. P., Wong, G. G. & Baumann, H.: IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins in vivo. *J. Immunol.*, **142**, 808-812 (1989).
- 10) Ramadori, G., Van Damme, J., Rieder, H. & Meyer zum Büschenfelde, K.-H.: Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1β and tumor necrosis factor- α . *Eur. J. Immunol.*, **18**, 1259-1264 (1988).
- 11) Bruno, E. & Hoffman, R.: Effect of interleukin 6 on in vitro human megakaryocytopoiesis: its interaction with other cytokines. *Exp. Hematol.*, **17**, 1038-1043 (1989).
- 12) Asano, S., Okano, A., Ozawa, K., Nakahata, T., Ishibashi, T., Koike, K., Kimura, H., Tanioka, Y., Shibuya, A., Hirano, T., Kishimoto, T., Takaku, F. & Akiyama, Y.: In vitro effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. *Blood*, **75**, 1602-1607 (1990).
- 13) Nagasawa, T., Orita, T., Matsushita, J., Tsuchiya, M., Neichi, T., Imazeki, I., Imai, N., Ochi, N., Kanma, H. & Abe, T.: Thrombopoietic activity of human interleukin-6. *FEBS Lett.*, **260**, 176-178 (1990).
- 14) Aarden, L. A., De Groot, E. R., Schaap, O. L. & Lansdrop, P. M.: Production of hybridoma growth factor by monocytes. *Eur. J. Immunol.*, **17**, 1411-1416 (1987).
- 15) Kato, K., Yokoi, T., Takano, N., Kanegane, H., Yachie, A., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.: Detection by in situ hybridization and phenotypic characterization of cells expressing IL-6 mRNA in human stimulated blood. *J. Immunol.*, **144**, 1317-1322 (1990).
- 16) Nordan, R. & Potter, M.: A macrophage-driven factor required by plasmacytoma for survival and proliferation in vitro. *Science*, **223**, 566-567 (1986).
- 17) May, L. T., Ghrayeb, J., Santhanam, U., Tatter, S. B., Sthoeger, Z., Helfgott, D. C., Chiorazzi, N., Grieninger, G. & Sehgal, P. B.:

- Synthesis and secretion of multiple forms of β -interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7760-7766 (1988).
- 18) Horii, Y., Muraguchi, A., Suematsu, S., Matsuda, T., Yoshizaki, K., Hirano, T. & Kishimoto, T.: Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. *J. Immunol.*, **141**, 1529-1535 (1988).
- 19) Le, J. & J. Vilcek.: Tumor necrosis factor and interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.*, **56**, 234-248 (1987).
- 20) Tosato, G. & Jones, K. D.: Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. *Blood*, **75**, 1305-1310 (1990).
- 21) Bauer, J., Ganter, U., Geiger, T., Jacobshagen, U., Hirano, T., Matsuda, T., Kishimoto, T., Andus, T., Acs, G., Gerok, W. & Ciliberto, G.: Regulation of interleukin-6 expression on cultured human blood monocytes and monocyte-derived macrophages. *Blood*, **72**, 1134-1140 (1988).
- 22) Dinarello, C. A., Ikejima, T., Warner, S. J. C., Orencole, S. F., Lonnemann, g., Cannon, J. G. & Libby, P.: Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *J. Immunol.*, **139**, 1902-1910 (1987).
- 23) Uhl, J., Newton, R. C., Giri, J. G., Sandlin, G. & Horuk, R.: Identification of IL-1 receptors on human monocytes. *J. Immunol.*, **142**, 1576-1581 (1989).
- 24) Imamura, K., Spriggs, D. & Kufe, D.: Expression of tumor necrosis factor receptors on human monocytes and internalization of receptor bound ligand. *J. Immunol.*, **139**, 2989-2992 (1987).
- 25) Bauer, J., Bauer, T. M., Kalb, T., Taga, T., Lengyel, G., Hirano, T., Kishimoto, T., Acs, G., Mayer, L. & Gerok, W.: Regulation of interleukin 6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J. Exp. Med.*, **170**, 1537-1549 (1989).
- 26) Dinarello, C. A.: Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Adv. Immunol.*, **44**, 153-205 (1989).
- 27) Yachie, A., Takano, N., Yokoi, T., Kato, K., Kasahara, Y., Miyawaki, T. & Taniguchi, N.: The capability of neonatal leukocytes to produce IL-6 on stimulation assessed by whole blood culture. *Pediatr. Res.*, **27**, 227-233 (1990).
- 28) Ueno, Y., Takano, N., Kanegane, H., Yokoi, T., Yachie, A., Miyawaki, t. & Taniguchi, N.: The acute phase nature of interleukin 6: studies in kawasaki disease and other febrile illnesses. *Clin. Exp. Immunol.*, **76**, 337-342 (1989).
- 29) Chomczynski, P. & Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-160 (1987).
- 30) White, B. A. & Bancroft, F. C.: Cytoplasmic dot hybridization. *J. Biol. Chem.*, **257**, 8569-8572 (1982).
- 31) March, C. J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D. P., Braedt, G., Prince, V., Gillis, S., Henney, C. S., Kronheim, S. R., Grabstein, K., Conlon, P. J., Hopp, T. P. & Cosman, D.: Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature*, **315**, 641-647 (1985).
- 32) Minty, A. J., Caravatti, M., Robert, B., Cohen, A., Daubas, P., Weydert, A., Gros, F. & Buckingham, M. E.: Mouse actin messenger RNAs. *J. Biol. Chem.*, **256**, 1008-1014 (1981).
- 33) Kohase, M., May, L. T., Tamm, I., Vilcek, J. & Sehgal, P. B.: A cytokine network in human diploid fibroblasts: interaction of β -interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived growth factor, and interleukin-1. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 273-280 (1987).
- 34) Shalaby, M. R., Waage, A. & Espevik, T.: Cytokine regulation of interleukin 6 production by human endothelial cells. *Cell. Immunol.*, **121**, 372-382 (1989).
- 35) Essner, R., Rhoades, K., McBride, W. H., Morton, D. L. & Economou, J. S.: IL-4 down-regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes. *J. Immunol.*, **142**, 3857-3861 (1989).
- 36) Navarro, N., Debili, N., Bernaudin, J., Vainchenker, W. & Doly, J.: Regulation of the expression of IL-6 in human monocytes. *J. Immunol.*, **142**, 4339-4345 (1989).

- 37) Philip, R. & Epstein, L. B.: Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, γ -interferon and interleukin-1. *Nature*, **323**, 86-89 (1986).
- 38) Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. C. & Dinarello, C. A.: Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, **75**, 40-47 (1990).
- 39) Fong, Y., Tracey, K. J., Moldawer, L. L., Hesse, D. G., Manogue, K. B., Kenney, J. S., Lee, A. T., Kuo, G. C., Allison, A. C., Lowry, S. F. & Cerami, A.: Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1β and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J. Exp. Med.*, **170**, 1627-1633 (1989).
- 40) Fong, Y., Moldawer, L. L., Marano, M., Wei, H., Tatter, S. B., Clarick, Santhanam, R. H. U. M. A., Sherris, D., May, L. T., Sehgal, P. B. & Lowry, S. F.: Endotoxemia elicits increased circulating β ₂IFN/IL-6 in man. *J. Immunol.*, **142**, 2321-2324 (1989).
- 41) Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P. & Espevik, T.: The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J. Exp. Med.*, **169**, 333-338 (1989).
- 42) Jablons, D. M., Mule, J. J., McIntosh, J. K., Sehgal, P. B., May, L. T., Huang, C. M., Rosenberg, S. A. & Lotze, M. T.: IL-6/IFN- β -2 as a circulating hormone. Induction by cytokine administration in humans. *J. Immunol.*, **142**, 1542-1547 (1989).
- 43) Broukaert, P., Spriggs, D. R., Demetri, G., Kufe, D. W. & Fiers, W.: Circulating interleukin 6 during a continuous infusion of tumor necrosis factor and interferon γ . *J. Exp. Med.*, **169**, 2257-2262 (1989).
- 44) McIntosh, J. K., Jablons, D. M., Mule, J. J., Nordon, R. P., Rudikoff, S., Lotze, M. T. & Rosenberg, S. A.: In vivo induction of IL-6 by administration of exogenous cytokines and detection of de novo serum levels of IL-6 in tumor-bearing mice. *J. Immunol.*, **143**, 162-167 (1989).
- 45) Hirano, T., Matsuda, T., Turner, M., Miyasaka, N., Buchan, G., Tang, B., Sato, K., Shimizu, M., Maini, R., Feldmann, M. & Kishimoto, T.: Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, **18**, 1797-1801 (1988).
- 46) Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., Tanaka, H., Kuramoto, A. & Kishimoto, T.: Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*, **332**, 83-85 (1988).
- 47) Horii, Y., Muraguchi, A., Iwano, M., Matsuda, T., Hirayama, T., Yamada, H., Fujii, Y., Dohi, K., Ishikawa, H., Ohmoto, Y., Yoshizaki, K., Hirano, T. & Kishimoto, T.: Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J. Immunol.*, **143**, 3949-3955 (1989).

Key words interleukin-6, interleukin-1, tumor necrosis factor- α , monocyte, cytokine network

Expression of monocyte-derived cytokines (monokines) is regulated by other monokines in an autocrine manner. To elucidate how the production of IL-6 (interleukin-6) could be modulated by three major monokines, namely IL-1 β (interleukin-1 β), TNF- α (tumor necrosis factor- α), and IL-6, the effects of recombinant preparations of these cytokines on IL-6 production by PBMC (peripheral blood mononuclear cells) were examined. Both rIL-1 β and rTNF- α were able to induce IL-6 activity in culture supernatants of PBMC, comparable to that seen upon stimulation with LPS (lipopolysaccharide). Expression of IL-6 messenger RNA (mRNA) was also found in the cultures of PBMC stimulated with rIL-1 β or rTNF- α . Additionally, IL-1 β mRNA expression in PBMC was induced by stimulation with rIL-1 β as well as rTNF- α . The in situ hybridization combined with immunofluorescence, using the corresponding monoclonal antibody, demonstrated that cells expressing mRNA for IL-6 or IL-1 β in these stimulated PBMC were actually CD14⁺ monocytes. The kinetics study indicated that IL-6 mRNA induction by rTNF- α , occurred somewhat later than that of rIL-1 β stimulation. It is important that anti-IL-1 antibodies significantly abolished IL-6 production due to rTNF- α . This fact suggests that rTNF- α stimulates IL-1 production and then IL-1 stimulates IL-6 production. In contrast, IL-6 appears to inhibit the production of other monokines, including IL-6 itself. These findings suggest that, TNF- α may play a pivotal role in the monokine cascade, and that IL-6 may provide a negative feedback signal for the whole series of events in cytokine induction in monocytes.